The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic Escherichia coli O157 : H7 strain derived from the Sakai outbreak.
Author(s)	横山, 勝志
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45257
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【24】

氏　　名	横　山　勝　志（よこやま かつし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１８４５２　号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学　位　論　文　名	Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 strain derived from the Sakai outbreak. **（堺市で発生した腸管出血性大腸菌 O157 : H7 に存在する志賀毒素１遺伝子を持つプロファージ VT1-Sakai の全塩基配列）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　品川日出夫 （副査） 教　授　堀口　安彦　　教　授　本田　武司

論　文　内　容　の　要　旨

〔目　　的〕

腸管出血性大腸菌 O157 : H7 は、出血性大腸炎を引き起こす病原性大腸菌の一種であり、その主要な病原因子は志賀毒素１や志賀毒素２である。O157 : H7 に存在する志賀毒素１をコードする *stx1* 遺伝子は溶原化したプロファージ上に存在する事が知られていたが、このプロファージの染色体上での挿入部位は不明であった。私は 1996 年に堺市で O157 : H7 による大規模な集団食中毒が発生した際に採取された RIMD 0509952 株を用い、*stx1* 遺伝子を持つこのプロファージの染色体上での挿入部位を決定すると共にその全 DNA 構造を明らかにする事を目的とした。

〔方法ならびに成績〕

O157 : H7 RIMD 0509952 株のゲノム DNA のコスミドライブラリーを作製し、*stx1* DNA をプローブとしたハイブリダイゼーション法により、*stx1* 遺伝子を持つコスミドクローンを得た。このコスミドクローンの全塩基配列を決定した結果、*stx1* 遺伝子は大腸菌 K12 の 47.7 分に相当する領域に挿入されたファージ様の塩基配列上に存在する事が判明した。更に、ゲノム DNA をテンプレートとした PCR を行う事により、コスミドクローンでカバーできなかった残りの O157 : H7 特異的領域の塩基配列を決定した。*stx1* 遺伝子は全長 47900 bp のプロファージ上に存在しており、このプロファージを VT1-Sakai と名付けた。

VT1-Sakai の塩基配列及び ORF は現在までに報告されている種々のファージと部分的に高い相同性を示し、その全体構造は多種のファージによるモザイク構造を成していた。VT1-Sakai の初期遺伝子の発現を調節する N・CI・Cro タンパクをコードする遺伝子はそれらの認識配列も含め *stx1* 遺伝子や *stx2* 遺伝子を持つこれまでに報告されていた他の O157 株のファージと異なっていた。*stx1* 遺伝子はファージの後期遺伝子の発現を調節する Q タンパクをコードする遺伝子の下流に位置していた。Q タンパク及びその認識配列は *stx1* 遺伝子や *stx2* 遺伝子を持つ他の O157 株のファージと高い相同性を示し、SOS 支配下にあると予想された。実際に RIMD 0509952 株を SOS 誘発剤であるマイトマイシン C で処理したところ、*stx1* 遺伝子を有するファージの誘導が起こり、志賀毒素１の生産量も増加した。

VT1-Sakai の尾部遺伝子群の下流に存在するラムダファージの b region に相当する領域の ORF の 1 つは、大腸菌 K12 の SOS 遺伝子群の一つである *dinI* 遺伝子と相同性を示し、この遺伝子を *hdiI* (homolog of *dinI*) と名付けた。*hdiI* 遺伝子はプロモーター領域に LexA 結合配列を持っていたので、実際に SOS 刺激により *hdiI* 遺伝子の発現が誘導されるかをマイトマイシン C での処理により調べたところ、その発現は K12 の *dinI* 遺伝子と同様に SOS 刺激により誘導された。プライマーエクステンション法により *hdiI* 遺伝子の mRNA の転写開始点を明らかにし、フットプリンティング法により *hdiI* 遺伝子のプロモーター領域に存在する LexA 結合部位を明らかにした。また、HdiI タンパクは SOS 刺激に対する SOS 遺伝子群の発現、ラムダファージの誘導、UmuD タンパクの切断を抑制していた。

〔総　　括〕

O157 : H7 RIMD 0509952 株に存在する VT1-Sakai の *N*・*cI*・*cro* 遺伝子及びそれらがコードするタンパクの認識配列が *stx1* 遺伝子や *stx2* 遺伝子を持つ既知のファージと異なるという事実は、*stx1* 遺伝子の伝達は異なる immune system を持つ種々のバクテリオファージによりもたらされている事を示唆している。その一方で、*Q* 遺伝子及びその認識配列は *stx1* 遺伝子を持つ既知のファージのそれらと高い相同性を示し、マイトマイシン C での処理により *stx1* 遺伝子を持つファージの誘導や志賀毒素 1 の高発現がみられた。この事はファージの誘導や毒素の発現が *stx1* 遺伝子を持つ既知の O157 : H7 株と同様に Q タンパクにより調節されている事を示している。RIMD 0509952 株由来のファージはプラーク形成能を欠いており、VT1-Sakai はそれ自体では完全なファージ粒子を生じない欠陥プロファージであった。

その原因は VT1-Sakai の頭部遺伝子への IS の挿入や尾部遺伝子のフレームシフトと考えられる。VT1-Sakai には、大腸菌 K12 の *dinI* 遺伝子と相同性を持つ遺伝子 *hdiI* が存在していた。*in vivo, in vitro* の解析により、この遺伝子の発現は SOS レプレッサーLexA の支配下にあり、その遺伝子産物は SOS 応答をフィードバック阻害している事を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究は、腸管出血性大腸菌 O157 : H7 の主要な病原因子である志賀毒素 1 遺伝子 *stx1* を含むプロファージ VT1-Sakai の全ゲノム配列を決定し、*stx1* の発現機構を明らかにした。VT1-Sakai のゲノム配列をデータベースを利用して比較解析した結果、このプロファージはラムダ型の多種のファージが組み合わさったキメラであり、尾部と頭部の遺伝子に変異を持つ欠陥プロファージであることを明らかにした。志賀毒素 1 の産生はファージ後期遺伝子発現を調節する *Q* 遺伝子によって正に制御されていることを明らかにした。

本研究は、社会的に注目された病原性大腸菌 O157 : H7 の主要な病原因子である志賀毒素 1 遺伝子 *stx1* を含むプロファージの全ゲノム構造を明らかにし、病原性遺伝子の水平伝達の機構、毒素遺伝子 *stx1* の発現制御機構の解明に多大の貢献をした。よって、本研究は学位の授与に値すると考えられる。